

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

NATÁLIA HOGETOP FREIRE

INIBIÇÃO DE G9A COMO UM POTENCIAL ALVO TERAPÊUTICO:
UMA AVALIAÇÃO EM TUMORES PEDIÁTRICOS

Porto Alegre

2019

NATÁLIA HOGETOP FREIRE

INIBIÇÃO DE G9A COMO UM POTENCIAL ALVO TERAPÊUTICO:
UMA AVALIAÇÃO EM TUMORES PEDIÁTRICOS

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Coorientadora: Dra. Bárbara Kunzler Souza

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Rafael Roesler, pela oportunidade, confiança e orientação;

À minha coorientadora, Bárbara, pela oportunidade de participar nesse trabalho incrível;

Aos meus colegas de laboratório, por todo apoio e risadas;

À Bruna, por ser uma mestranda maravilhosa que me ajudou muito na finalização do projeto;

À minha primeira doutoranda, Kelly, por proporcionar a chance de aprender e descobrir como é empolgante o meio científico;

À Mari, gostaria de fazer um agradecimento especial, por sempre estar disposta a me amparar em todos os aspectos do trabalho e fora dele também;

Às minhas amigas, Laura e Isabela, por todos os momentos de alegria e sofrimento nesses últimos 4 anos;

Ao meu amigo Áxil, por sempre escutar os meus desabafos;

Aos meus pais, Juliana e Marcelo, por toda força, carinho e apoio durante todos esses anos;

Ao meu irmão, pela playlist maravilhosa que guiou toda escrita do tcc;

A todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui, muito obrigada!

RESUMO

Tumores pediátricos são considerados neoplasias raras, apesar disso, são vistas como a segunda maior causa de óbito em pacientes pediátricos. Em conjunto, os tumores meduloblastoma, neuroblastoma e sarcoma de Ewing, são responsáveis por mais de 30% dos casos de neoplasias pediátricas. Mecanismos epigenéticos têm sido considerados importantes para o desenvolvimento e progressão tumoral, dessa forma, o presente estudo buscou explorar o papel da histona metiltransferase G9a em processos celulares relevantes para o desenvolvimento das neoplasias pediátricas meduloblastoma, neuroblastoma e sarcoma de Ewing. Os resultados obtidos sugerem que existe uma associação entre os níveis de G9a e a tumorigenicidade desses tumores. Além disso, foi encontrado que inibição da atividade de G9a e a alteração dos níveis de dimetilação de H3K9 estão envolvidos na manutenção da viabilidade celular, na expressão de genes supressores tumorais e na capacidade de sobrevivência das linhagens celulares estudadas. Assim, os dados obtidos nesse estudo podem ser considerados informações preliminares sobre o papel da enzima metiltransferase G9a na biologia de tumores sólidos pediátricos.

Palavras-chave: G9a, meduloblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing

ABSTRACT

Pediatric tumors are considered a rare type of cancer. Despite that, they are the second leading cause of death in pediatric patients. Medulloblastoma, neuroblastoma, and Ewing's sarcoma account for more than 30% of pediatric neoplasms. Epigenetic mechanisms are important for tumor development and progression. The present study seeks to explore the role of histone methyltransferase G9a in cellular processes relevant to the development of medulloblastoma, neuroblastoma and Ewing's sarcoma. The results obtained suggest that there is an association between G9a levels and the tumorigenicity of these tumors. In addition, inhibition of G9a activity and alteration of H3K9 methylation levels were found to be involved in cell viability, gene expression and survivability of the studied cell lines. These results can be considered preliminary data about the role of the enzyme methyltransferase G9a in the biology of pediatric solid tumors.

Key words: G9a, medulloblastoma, neuroblastoma, Ewing's sarcoma

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação dos principais mecanismos epigenéticos.....	16
FIGURA 2 – Padrões de modificações em histonas.....	17
FIGURA 3 – Representação da função enzimática de G9a.....	18
FIGURA 4 – Representação esquemática da estrutura proteica de G9a	18
FIGURA 5 – Níveis transcricionais de <i>G9a</i> nas linhagens celulares	26
FIGURA 6 – Efeito de UNC0642 sobre a viabilidade celular de linhagens de tumores pediátricos	27
FIGURA 7 – Representação do efeito morfológico em linhagens de tumores pediátricos após tratamento com UNC0642.....	29
FIGURA 8 – Níveis relativos de mRNA de <i>G9a</i> em linhagens de tumores pediátricos.....	30
FIGURA 9 – Níveis relativos de mRNA de <i>G9a</i> em linhagens de tumores pediátricos após tratamento com UNC0642.....	30
FIGURA 10 – Níveis transcricionais relativos dos supressores tumorais <i>p16INK4a</i> e <i>p21Cip1/Waf1</i> em linhagens de tumores pediátricos antes e após tratamento com UNC0642.....	31
FIGURA 11 – Avaliação do nível relativo transcricional de <i>BCL2</i> em linhagens de tumores pediátricos antes e após tratamento com UNC0642.....	32
FIGURA 12 – Avaliação dos níveis de dimetilação de H3K9 em linhagens de meduloblastoma após tratamento com UNC0642.....	33
FIGURA 13 – Ensaio de sobrevivência celular nas linhagens de tumores pediátricos após tratamento com UNC0642.....	35
FIGURA 14 – Ação do inibidor de G9a, UNC0642.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Sequência de primers	23
TABELA 2 – Valores de IC ₅₀ de UNC0642 das linhagens de tumores pediátricos	28

LISTA DE SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

cDNA – cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês, *complementary deoxyribonucleic acid*

DMEM – Meio de Eagle modificado da Dulbecco, do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês, *deoxyribonucleic acid*

EHMT2 – histona lisina metiltransferase eucariótica 2

GLP – G9a-like

H2BK5me – mono metilação da histona 2B lisina 5

H3K27me3 – trimetilação da histona 3 lisina 27

H3K36me3 – trimetilação da histona 3 lisina 36

H3K4me3 – trimetilação da histona 3 lisina 4

H3K79me3 – trimetilação da histona 3 lisina 79

H3K9me2 – dimetilação da histona 3 lisina 9

H3K9me3 – trimetilação da histona 3 lisina 9

H4K20me – mono metilação da histona 4 lisina 20

IARC – Agência Internacional de pesquisa em Cancer, do inglês, *International Agency for Research on Cancer*

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

mRNA – RNA mensageiro

NIH – *National Cancer Institute*

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – Probabilidade de Significância

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil, do inglês, *phenylmethanesulfonyl fluoride*

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês, *ribonucleic acid*

RT-PCR – Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR – reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sufato de Sódio, do inglês, *polyacrylamide gel electrophoresis*

SFB – Soro fetal bovino

SHH – Sonic Hedgehog

μM – Micromolar

SUMÁRIO

1.1 CÂNCER	11
1.2 CÂNCER PEDIÁTRICO	12
1.2.1 Meduloblastoma	13
1.2.2 Neuroblastoma	14
1.2.3 Sarcoma de Ewing.....	15
1.3 EPIGENÉTICA	15
1.3.1 Histona metiltransferase G9a.....	18
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 LINHAGENS E CULTIVO CELULAR	22
4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO G9A NAS LINHAGENS CELULARES.....	22
4.3 TRATAMENTOS	23
4.4 VIABILIDADE CELULAR E DETERMINAÇÃO DE IC ₅₀ de UNC0642	23
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE G9A, P16INK4A, P21CIP1/WAF1 E BCL2 E EFEITO APÓS A INIBIÇÃO DE G9A.	23
4.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE DIMETILAÇÃO DE H3K9.....	24
4.7 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA CELULAR (CLONOGÊNICO)	24
5 RESULTADOS.....	26
5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE G9A NAS LINHAGENS CELULARES.....	26
5.2 VIABILIDADE CELULAR E DETERMINAÇÃO DE IC ₅₀	26
5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE G9A E EFEITO APÓS A INIBIÇÃO DE G9A	29
5.4 ANÁLISE DE GENES SUPRESSORES TUMORAIS.....	30
5.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO RELATIVA DE BCL2	32
5.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE DIMETILAÇÃO DE H3K9.....	32
5.7 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA CELULAR	33
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 doenças que apresentam como característica principal a proliferação celular desordenada. Por se tratar de uma doença abrangente foram propostas características fisiológicas comuns que permitem o estabelecimento das células tumorais. Inicialmente, foi determinado como propriedades comuns ao câncer a capacidade de autossuficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade a sinais antiproliferativos, a evasão de apoptose, o potencial replicativo ilimitado, o potencial de angiogênese, a invasão tecidual e a metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Com o avanço nas técnicas moleculares, celulares e bioquímicas foi possível encontrar novos traços importantes para biologia do câncer, assim tem se considerado que a evasão do sistema imune e a reprogramação do metabolismo energético também são marcas dessa doença (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015 o câncer foi considerado a primeira ou segunda causa de morte antes dos 70 anos em 91 dos 172 países. Para o ano de 2018 foi estimado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) que haveriam 18.1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de óbitos por câncer na população mundial (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018). Estimativas para o ano de 2019 preveem que, nos Estados Unidos, ocorrerão 1,762,450 novos diagnósticos de câncer e que mais de 600 mil serão levados a óbito (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), ocorrerão 600 mil casos novos de câncer no ano de 2019. A incidência dos tipos tumorais são: próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) para homens e cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) para mulheres (INCA, 2018). A alta incidência observada em alguns tipos tumorais é correlacionada a fatores de risco, como tabagismo, sedentarismo, alimentação desregulada.

Atualmente, um dos fatores mais importantes no combate do câncer é o diagnóstico precoce, visto que se detectada em fases iniciais é mais provável que a

neoplasia seja responsiva ao tratamento e que o paciente tenha um melhor prognóstico (WHO, 2017). Segundo o *National Cancer Institute* (NIH) o tratamento para câncer depende do tipo e estágio do tumor, mas de uma maneira geral as terapias empregadas são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia hormonal. Apesar de existirem diversos tratamentos, vale lembrar que efeitos colaterais às terapias podem ocorrer e que existem pacientes refratários a esses tratamentos, revelando a necessidade de aprimoramento e o estabelecimento de novas terapias (**Types of Cancer Treatment**, 2019).

1.2 CÂNCER PEDIÁTRICO

O câncer pediátrico compreende um grupo de doenças que atinge, em sua maioria, células do sistema sanguíneo e tecidos de sustentação. Uma característica similar entre essas neoplasias é a proliferação desordenada e a possibilidade de aparecimento em diversas regiões do corpo (INCA, 2018). Enquanto tumores adultos podem ser associados a fatores de risco externos, tumores pediátricos não possuem esse viés, visto que ocorrem devidos a alterações de origem, predominantemente, embrionárias (MARIS; DENNY, 2002). Em comparação com o câncer em adultos, as neoplasias pediátricas tem a tendência de apresentarem menores períodos de latência, crescerem de maneira acelerada, com maiores chances de serem invasivas mas também possuem melhores respostas à quimioterapia (PEDIATRIA, 2017).

De acordo com a *American Cancer Society* estima-se que para o ano de 2019 as neoplasias pediátricas mais frequentes serão: leucemias (28%), seguida por tumores do sistema nervoso central (26%), linfomas (8%) e tumores de sistema nervoso periférico (6%) (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). No Brasil estima-se que, em média, o percentual de tumores infanto juvenis observados será de 3%, portanto, calcula-se que ocorrerão 12.500 casos novos de câncer em crianças e adolescentes (entre 0 e 19 anos). Assim o câncer pediátrico pode ser considerado a segunda maior causa de óbitos, ficando atrás apenas das mortes por causas externas (INCA, 2018).

1.2.1 Meduloblastoma

Meduloblastoma é o segundo tumor maligno mais frequente em pacientes pediátricos, podendo ser considerado a maior causa de mortalidade e morbidade em crianças (PEDIATRIA, 2017). Possui origem neuroectodérmica e ocorre principalmente na fossa posterior e no cerebelo (PIZER; CLIFFORD, 2009).

Clinicamente, os sintomas dessa neoplasia podem ser abrangentes pois dependem da localização do tumor e da idade do paciente. Em estádios mais avançados da doença, os sintomas são geralmente associados ao aumento da pressão intracranial, que pode se manifestar por meio de letargia, dores de cabeça, náuseas, vômito e alterações visuais (MILLARD; DE BRAGANCA, 2016).

Com os avanços nos estudos genômicos, epigenéticos e transcriptômicos, foi possível estabelecer quatro principais subgrupos moleculares para essa neoplasia (NORTHCOTT; KORSHUNOV; WITT; HIELSCHER *et al.*, 2011). Os subgrupos são denominados: Wnt, Sonic Hedgehog (SHH), Grupo 3 e Grupo 4 e apresentam diferentes perfis transcricionais, alterações genéticas, a ativação em vias de sinalização e prognóstico clínico (TAYLOR; NORTHCOTT; KORSHUNOV; REMKE *et al.*, 2012).

Wnt é o subgrupo que possui melhor prognóstico e chances de sobrevivência e as principais mutações presentes neste subgrupo estão localizadas nos genes APC e CTNNB1. As duas alterações estão associadas a via de sinalização Wingless/Wnt, que proporcionou o nome para o subgrupo.

O subgrupo SHH, nomeado pela via de sinalização Sonic Hedgehog, possui heterogeneidade quanto a biologia e prognóstico clínico, uma vez que foram identificados 4 subtipos de meduloblastoma SHH (CAVALLI; REMKE; RAMPASEK; PEACOCK *et al.*, 2017). Em geral, o prognóstico é intermediário, mas mutações em TP53 podem diminuir as chances de sobrevivência (ZHUKOVA; RAMASWAMY; REMKE; PFAFF *et al.*, 2013).

O grupo 3 possui o pior prognóstico entre os grupos, visto que, muitos pacientes desenvolvem metástases e possuem amplificações em MYC, que são fatores de risco para o tratamento dessa neoplasia (NORTHCOTT; KORSHUNOV; PFISTER; TAYLOR, 2012) (NORTHCOTT; SHIH; PEACOCK; GARZIA *et al.*, 2012).

As características biológicas do grupo 4 ainda são pouco entendidas, apesar disso, uma das alterações genéticas mais frequentes é a instabilidade

cromossômica que ocorre no isocromossomo 17q (KOOL; KORSHUNOV; REMKE; JONES *et al.*, 2012). Esse grupo possui um prognóstico intermediário uma vez que possui baixas taxas de metástase e não possui altos níveis de expressão dos fatores de risco MYC e MYCN (NORTHCOTT; KORSHUNOV; PFISTER; TAYLOR, 2012).

1.2.2 Neuroblastoma

O neuroblastoma é o tumor sólido extracraniano mais comum em pacientes pediátricos. Essa neoplasia é principalmente encontrada no início da infância, visto que, 90% dos tumores ocorrem antes da primeira década de vida e a idade média do diagnóstico é de 18 meses de vida (LONDON; CASTLEBERRY; MATTHAY; LOOK *et al.*, 2005). Assim, o neuroblastoma é um tumor raramente encontrado em adolescentes e adultos.

O neuroblastoma tem origem nas células da crista neural, dessa forma pode se estabelecer ao longo de todo o sistema nervoso simpático (CHEUNG; DYER, 2013). Os tumores primários são comumente encontrados no abdômen, principalmente na medula adrenal, mas também, é possível encontrar no pescoço, peito e pélvis (MARIS; HOGARTY; BAGATELL; COHN, 2007). A apresentação clínica está associada à localização do tumor primário, podendo causar sintomas associados à hipertensão, dor e distensão abdominal (AHMED; ZHANG; REDDIVALLA; HETHERINGTON, 2017). Metástases são encontradas em mais de 50% dos pacientes no momento do diagnóstico. Apesar disso, existem casos de regressão espontânea dessa neoplasia, especialmente em pacientes com menos de um ano de idade e com metástases limitadas. Não se sabe ao certo como as regressões ocorrem, mas estudos sugerem a participação do sistema imune e da expressão de *TERT* (HIYAMA; HIYAMA; YOKOYAMA; MATSUURA *et al.*, 1995), gene que codifica a transcriptase reversa da telomerase como fatores importantes para esse fenômeno.

As alterações mais importantes para a biologia do neuroblastoma envolvem amplificações gênicas. A amplificação mais conhecida é do gene MYCN, um regulador transcricional que afeta diferentes características tumorais, em especial, a manutenção do crescimento e a formação de metástases. Estudos mostram que MYCN influencia o crescimento através da promoção da progressão do ciclo celular

ao alterar genes responsáveis pela regulação do ciclo celular (BELL; LUNEC; TWEDDLE, 2007). O MYCN também contribui para o desenvolvimento de metástases, pois altera a capacidade de invasão e migração das células tumorais, permitindo seu estabelecimento em outros tecidos (TANAKA; FUKUZAWA, 2008).

1.2.3 Sarcoma de Ewing

O sarcoma de Ewing é um tumor sólido que acomete ossos e tecidos moles e, apesar de ser uma neoplasia rara, é considerada muito agressiva visto que o aparecimento de metástases é extremamente comum. É caracterizado por ser um tumor de células pouco diferenciadas, redondas e com coloração azulada (ROSS; SMYTH; MURAWSKI; KENNEDY, 2013). Existe uma controvérsia em relação à célula de origem desse tumor, uma vez que pode apresentar características de células neuroectodérmicas ou de células tronco mesenquimais (LIN; WANG; LOZANO, 2011).

Estima-se que mais de 90% dos pacientes com sarcoma de Ewing possuam uma das características genéticas mais importantes nesse tumor, isto é, a fusão dos genes EWS-ETS, que permite a presença de um fator de transcrição, que irá contribuir para a malignidade deste câncer (TOOMEY; SCHIFFMAN; LESSNICK, 2010). Os genes da família ETS, que geralmente estão fusionados com os genes da família EWS são: FLI1 (90–95%), ERG (5–10%); e em menos de 1% dos casos temos os genes FEV, ETV1 e ETV4 (ORDÓÑEZ; OSUNA; HERRERO; DE ALAVA *et al.*, 2009). A translocação t(11;22) (q24;12) é a mais frequente e acredita-se que a proteína produto dessa fusão tenha um papel oncogênico, visto que, existem estudos que associam essa proteína quimérica com o desenvolvimento e manutenção desse tumor (ARVAND; DENNY, 2001). Além disso, análises do perfil gênico demonstraram que existem poucos genes com mutações significativas para a biologia do sarcoma de Ewing, apontando a importância dos rearranjos cromossômicos para essa neoplasia (CROMPTON; STEWART; TAYLOR-WEINER; ALEXE *et al.*, 2014).

1.3 EPIGENÉTICA

O conceito de epigenética foi originalmente descrito como mudanças hereditárias no fenótipo celular independentes de alterações na sequência de DNA (WADDINGTON, 1968). Atualmente, o termo epigenética abrange mudanças na cromatina que regulam processos no DNA. Assim, as modificações epigenéticas estão envolvidas em processos como transcrição, reparo de DNA e replicação (DUCASSE; BROWN, 2006). As alterações no epigenoma incluem metilação no DNA, regulação por microRNAs, modificações nas histonas e em proteínas associadas a cromatina (Figura 1). Essas alterações podem proporcionar um mecanismo de silenciamento gênico que é essencial para a regulação da expressão gênica e para a arquitetura da cromatina.

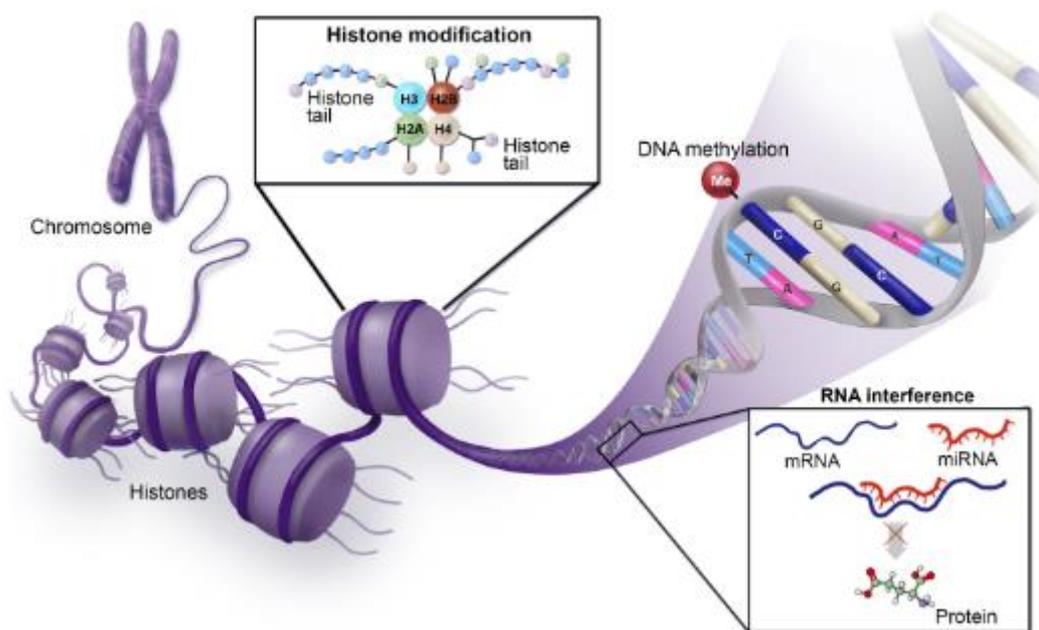


Figura 1: Representação dos principais mecanismos epigenéticos. Fonte: American Society of Hematology (2017).

O material genético dentro das células é organizado em formato de cromatina e a unidade essencial são os nucleossomos. Estes são formados por um octâmero de histonas (H3, H4, H2A, H2B), que são proteínas que possuem um centro globular e uma cauda N-terminal com diferentes resíduos permitindo a ocorrência de modificações (JENUWEIN; ALLIS, 2001). As principais modificações em histonas são: acetilação, metilação e fosforilação.

A metilação de histonas ocorre nos resíduos lisina (K) e arginina (R), que podem ser mono, di e tri metilados mono ou di (simétrica ou assimétrica) metilados, respectivamente (KOUZARIDES, 2007). As enzimas responsáveis por adicionar o

grupamento metil são as histonas metiltransferases e as que são capazes de retirar o grupamento são as histonas demetilases. Os diferentes padrões de metilação (Figura 2) estão associados a diferentes funções, como por exemplo, a trimetilação da lisina, H3K4me3, H3K36me3 e H3K79me3, e a monometilação, H4K20me e H2BK5me, que resultam na ativação gênica, enquanto di ou trimetilação, H3K9me2 e H3K9me3, e trimetilação de H3K27me3 ocasionam repressão gênica (BARSKI; CUDDAPAH; CUI; ROH *et al.*, 2007).

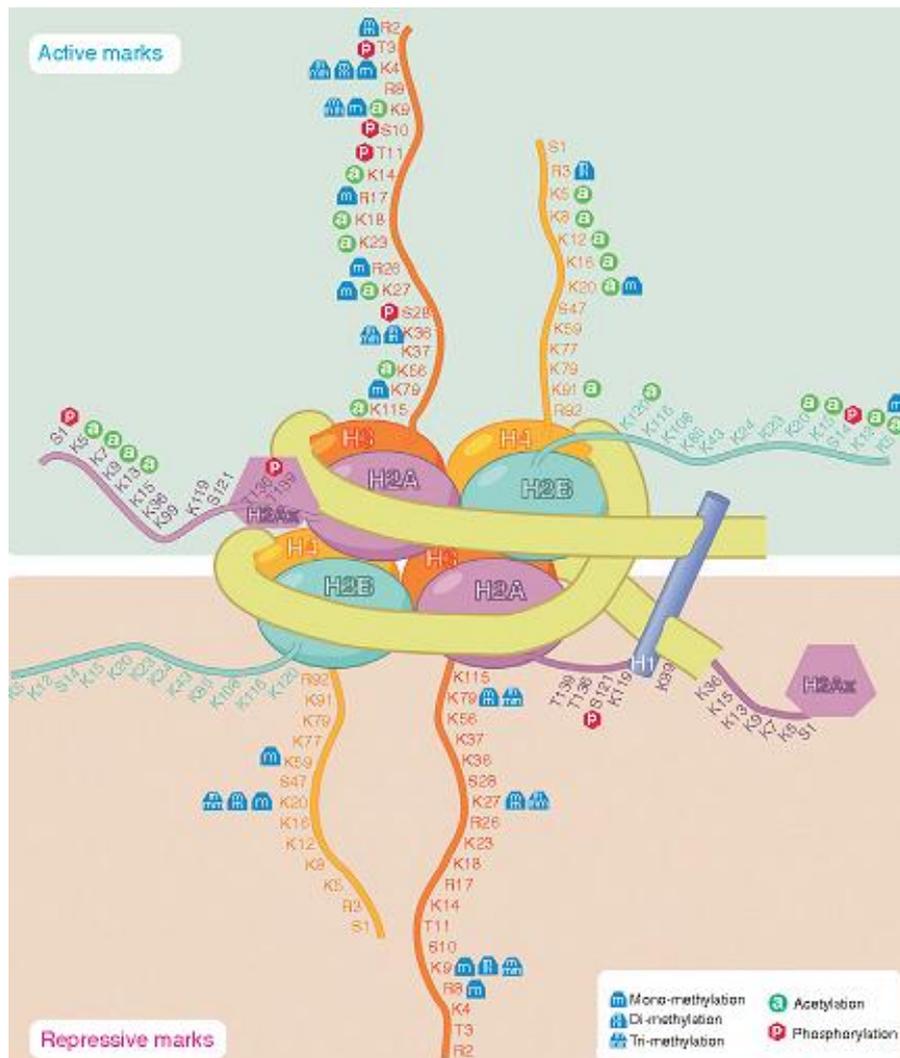


Figura 2: Padrões de modificações em histonas. Adaptado de: Audia *et al.* (2016).

Estudos recentes mostram que os mecanismos epigenéticos regulatórios possuem um papel essencial em inúmeras neoplasias, uma vez que, no processo de tumorigênese, as alterações genéticas são parcialmente responsáveis pela formação tumoral, revelando que modificações epigenéticas podem ter um papel fundamental nesse processo (DAWSON; KOUZARIDES, 2012) (SANTOS-REBOUÇAS; PIMENTEL, 2007). Estudos sugerem que mais de 300 genes e seus

produtos estão epigeneticamente alterados em inúmeros cânceres através de mecanismos como acetilação de histonas (KANWAL; GUPTA, 2010; NÖR; SASSI; DE FARIAS; SCHWARTSMANN *et al.*, 2013; SOUZA; DA COSTA LOPEZ; MENEGOTTO; VIEIRA *et al.*, 2018). Dito isso, é sugerido que alterações no epigenoma contribuem para o desenvolvimento tumoral por estarem envolvidas na iniciação, promoção, invasão, formação de metástases e resistência quimioterápica (DUCASSE; BROWN, 2006).

1.3.1 Histona metiltransferase G9a

A histona metiltransferase G9a, também conhecida como EHMT2 (histona lisina metiltransferase eucariótica 2), é uma enzima responsável pela mono e dimetilação da histona 3 lisina 9 (H3K9) (Figura 3), que frequentemente está associada a repressão gênica. G9a pertence à família Su(var)3-9 e estruturalmente é composta por um domínio catalítico SET e repetições de *ankyrin* (Figura 4) (SHINKAI; TACHIBANA, 2011). O domínio SET é responsável pela adição do grupo metil na histona 3 e as repetições de *ankyrin* estão associadas às regiões de ligação da mono e dimetilação (COLLINS; NORTHROP; HORTON; LEE *et al.*, 2008). Estudos recentes mostram que a proteína G9a-like (GLP) tem um papel essencial no mecanismo de metiltransferase de G9a, uma vez que GLP forma um complexo heterodimérico com G9a e essa estrutura é a forma ativa e predominante para ocorrer a mono e dimetilação da H3K9 (TACHIBANA; UEDA; FUKUDA; TAKEDA *et al.*, 2005).

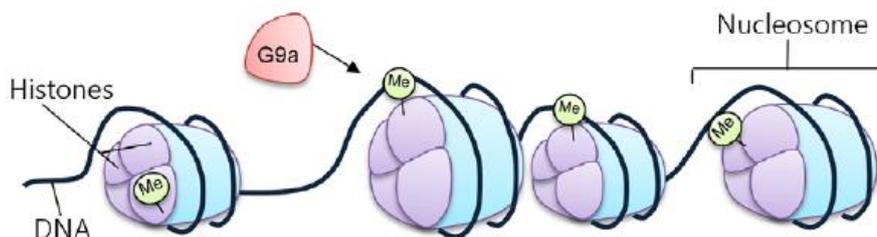


Figura 3: Representação da função enzimática de G9a. Fonte: Casciello *et al.* (2015).

G9a (EHMT2)

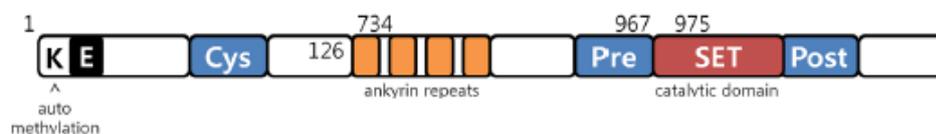


Figura 4: Representação esquemática da estrutura proteica de G9a. Fonte: Casciello *et al.* (2015).

As modificações que ocorrem nas histonas são essenciais para diversos mecanismos, como a regulação da transcrição, a condensação dos cromossomos e a formação da heterocromatina. Assim, pode-se perceber a importância da enzima G9a no contexto celular, visto que a mono e dimetilação da H3K9 está relacionada à formação da heterocromatina, que por sua vez contribui para o silenciamento gênico (BARSKI; CUDDAPAH; CUI; ROH *et al.*, 2007).

Além disso, estudos apontam uma associação entre G9a e baixos níveis de oxigênio, visto que os níveis de G9a aumentam com hipóxia levando a um aumento nos níveis de metilação, demonstrando uma participação de G9a em situação de sobrevivência celular (CHEN; YAN; DAVIDSON; SHINKAI *et al.*, 2006). Logo acredita-se que em tumores sólidos, que possuem um ambiente com um limitado nível de oxigênio, G9a poderia atuar como um fator essencial na tumorigênese. Além disso, em diversos tipos tumorais há uma associação de altos níveis de G9a à piores prognósticos, à repressão de genes supressores tumorais (HUANG; DORSEY; CHUIKOV; PÉREZ-BURGOS *et al.*, 2010) e à formação de metástases (CHEN; HUA; KAO; CHI *et al.*, 2010). Assim, a hipótese desse trabalho é que existe a possibilidade que a inibição da atividade da G9a seja capaz de reestabelecer a expressão de genes supressores tumorais, diminuir a capacidade de sobrevivência e inibir a proliferação em tumores sólidos pediátricos.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de existirem muitos estudos em relação ao tratamento de tumores sólidos pediátricos, os tratamentos empregados atualmente apresentam alta toxicidade, acarretando efeitos permanentes nos pacientes. Além disso, existem pacientes refratários a esses tratamentos, portanto, o melhor entendimento da biologia desses tumores se faz necessário.

Dado que existe uma correlação entre altos níveis de G9a e piores prognósticos clínicos e que existem poucos estudos abordando o papel dessa enzima na biologia das neoplasias pediátricas, torna-se relevante compreender o papel de G9a em tumores sólidos pediátricos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Definir os efeitos da inibição farmacológica da enzima G9a em células de tumores sólidos pediátricos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Verificar os níveis transcricionais de *G9a* nas linhagens celulares dos tumores sólidos pediátricos meduloblastoma, neuroblastoma e sarcoma de Ewing;
- 3.2.2 Avaliar a viabilidade e capacidade de sobrevivência celular de linhagens de tumores sólidos pediátricos meduloblastoma, neuroblastoma e sarcoma de Ewing após tratamento com inibidor farmacológico de *G9a*;
- 3.2.3 Verificar os níveis de expressão relativos de *G9a* nas linhagens celulares abordadas;
- 3.2.4 Analisar os níveis de expressão de *G9a* nas linhagens de tumores sólidos pediátricos meduloblastoma, neuroblastoma e sarcoma de Ewing após o tratamento com inibidor de *G9a*;
- 3.2.5 Avaliar a expressão dos genes supressores tumorais *p16INK4a* e *p21Cip1/Waf1* nas linhagens de tumores sólidos pediátricos meduloblastoma, neuroblastoma e sarcoma de Ewing após o tratamento com inibidor de *G9a*;
- 3.2.6 Verificar os níveis relativos do gene relacionado à ativação de apoptose, *BCL2*, após a inibição de *G9a* em linhagens de tumores sólidos pediátricos meduloblastoma, neuroblastoma e Sarcoma de Ewing.
- 3.2.7 Verificar os níveis de dimetilação do resíduo de lisina 9 na histona 3 (H3K9me2) após inibição de *G9a* nas linhagens celulares analisadas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS E CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas seis linhagens de tumores sólidos pediátricos obtidos do American Tissue Type Collection (ATCC). Linhagens de neuroblastoma: SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) e SK-N-BE(2) (ATCC® CRL-2271™); sarcoma de Ewing: SK-ES-1 (ATCC® HTB-86™) e RD-ES (ATCC® HTB-166™); meduloblastoma: DAOY (ATCC® HTB-186™) e D283 Med (ATCC® HTB-185™). As células de neuroblastoma e sarcoma de Ewing foram cultivadas com RPMI 1640 e as de meduloblastoma com Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) suplementadas 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% penicilina (100 U/mL) e streptomina (100 µg/mL) e 0,1% de anfotericina B (0,25 µg/mL). Todas as células foram mantidas a 37°C em ambiente umidificado e na presença de 5% de CO₂.

4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO G9A NAS LINHAGENS CELULARES.

Para analisar a presença de RNA mensageiro (mRNA) de G9a nas linhagens foi realizado um RT-PCR (reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase). Para isso, as células foram cultivadas e foi obtido pellets de cerca de 1×10^6 células. A extração de RNA foi realizada com o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Z3100). As amostras foram quantificadas por espectrofotômetro NanoDrop em 260 nm de comprimento de onda. Para a síntese do DNA complementar (cDNA), foi utilizado o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, A5000). A reação de PCR foi realizada com GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega) e foram utilizados os primers para G9a e ACTB (Tabela 1), as amostras foram separadas em um gel de 1% de agarose (Invitrogen). Esse método foi realizado em triplicata biológica.

Tabela 1 - Sequência dos primers.

Gene	<i>Foward (5' – 3')</i>	<i>Reverse (5' – 3')</i>
<i>G9a</i>	<i>GAG GTG TAC TGC ATA GAT GCC</i>	<i>CAG ACG GTC CTG CTC CAG GGC</i>
<i>ACTB</i>	<i>AAA CTG GAA CGG TGA AGG TG</i>	<i>AGA GAA GTG GGG TGG CTT TT</i>
<i>P16</i>	<i>GCA CCA GAG GCA GTA ACC AT</i>	<i>TTT CCC GAG GTT TCT CAG AGC</i>
<i>P21</i>	<i>ACT CTC AGG GTC GAA AAG GG</i>	<i>CTT CCT GTG GGC GGA TTA GG</i>
<i>BCL2</i>	<i>GTC GAT GAC TGA GTA CCTV GAA C</i>	<i>GCC AGG AGA AAT CAA ACA GAG G</i>

4.3 TRATAMENTOS

Foi utilizado o inibidor seletivo para G9a, UNC0642 (Sigma-Aldrich) diluído em DMSO (Sigma-Aldrich). Para os experimentos desse trabalho foi utilizado o tempo de tratamento de 72 horas, baseado no estudo que utiliza este inibidor em pesquisa antitumoral (CAO; SUN; LI; DONG *et al.*, 2019).

4.4 VIABILIDADE CELULAR E DETERMINAÇÃO DE IC₅₀

As células foram plaqueadas e tratadas com UNC0642 nas doses 0,12; 0,23; 0,47; 0,94; 1,88; 3,75; 7,5; 15; 30 µM. Após 72h as células foram quantificadas em hemocítmetro com azul de tripan e a viabilidade celular foi verificada nas diferentes doses. Foi realizado um controle (somente meio de cultura) e outro com veículo (DMSO) para descartar o efeito de citotoxicidade do veículo. Esse método foi realizado em triplicata biológica. A partir das curvas de dose foi possível determinar o IC₅₀ de UNC0642 de cada uma das linhagens utilizando o software GraphPad Prism 6.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE *G9A*, *P16INK4A*, *P21CIP1/WAF1* E *BCL2* E EFEITO APÓS A INIBIÇÃO DE *G9A*.

Para verificar os níveis de mRNA dos genes *G9a*, *p16INK4a*, *p21Cip1/Waf1* e *BCL2* nas linhagens celulares e se esses níveis foram alterados com tratamento, foi realizado a técnica de RT-qPCR. Foram obtidos pellets de células não tratadas e tratadas com seu respectivo IC₅₀. A extração de RNA foi realizada com o kit o SV Total RNA Isolation System, da Promega (Z3100). As amostras foram quantificadas

por espectrofotômetro NanoDrop em 260 nm de comprimento de onda e para a síntese do cDNA, foi utilizado o GoScript™ Reverse Transcription System, Promega (A5000). Para realização de qPCR foi utilizado PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix da ThermoFisher (A25742). O *input* utilizado foi de 10ng de amostra e foram usados os mesmos primers (Tabela 1) descritos no método 4.2. O gene normalizador utilizado foi *ACTB* e a análise dos dados por meio do método $\Delta \Delta CT$. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

4.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE DIMETILAÇÃO DE H3K9

Para avaliar os níveis de dimetilação da histona 3 lisina 9 foi realizada técnica de Western Blotting. Foram obtidos pellets de células não tratadas e tratadas com seu respectivo IC_{50} . As proteínas foram extraídas por meio do reagente *Cell Lyses Buffer* (Cell Signaling Technology), com a adição de PMSF e inibidores de protease (Sigma-Aldrich). Foi estipulado um *input* de 20 ng de proteínas por amostra, que foram resolvidas por SDS-PAGE 14% à 90V por 30 minutos e 120V por 90 minutos em cuba vertical eletroforética (BioRad), em tampão Tris-glicina-SDS. Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto polivinilideno (PVDF) em sistema úmido com tampão Tris-Glicina-SDS-Metanol à 90 V por 210 minutos. Como agente de bloqueio foi utilizado MTTBS (5% leite em solução de TBS contendo 0,1% Tween) durante 1h em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários: anti-H3K9me2 (1:1000) (abcam ab1220) por 90 minutos em temperatura ambiente e anti- β -actina (1:1000) (santa cruz sc-4778), anti-H3 (1:300) (santa cruz sc-10809) por 16h. O anticorpo secundário utilizado foi anti-mouse IgG (1:2000) (Sigma-Aldrich) ou anti-rabbit IgG (1:2000) (Sigma-Aldrich) conjugado à peroxidase durante 1 h. As membranas foram reveladas com o reagente de detecção ECL (Millipore), e a quimioluminescência foi detectada usando o sistema de imagem ImageQuant LAS 500.

4.7 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA CELULAR (CLONOGÊNICO)

Nesse ensaio as células foram expostas a três diferentes condições: veículo (DMSO), dose referente ao IC_{50} e uma dose aproximadamente cinco vezes menor que o IC_{50} . Após 72 horas, as células tratadas e não tratadas foram replaqueadas e

cultivadas em placas de 6 poços por 7 dias. Foram realizados dois desenhos experimentais: o primeiro em que as células replaqueadas foram mantidas em meio sem tratamento e o segundo em que as células foram mantidas em meio com a presença do inibidor na concentração em que foram tratadas na primeira etapa. Posteriormente, as colônias foram fixadas com etanol 70% e coradas com 0,5% cristal violeta.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as comparações entre dois grupos foi utilizado Teste T não pareado. Nos experimentos com mais de dois grupos de comparação foi realizada ANOVA seguido de teste de Bonferroni. Os valores de significância do P foram: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE G9A NAS LINHAGENS CELULARES

Para iniciar esse estudo, foi verificado a presença mRNA de G9a, nas diferentes linhagens celulares referentes aos tumores: meduloblastoma, neuroblastoma e sarcoma de Ewing. Para esse teste foi realizado um RT-PCR e o resultado mostra que todas as linhagens celulares expressão G9a (Figura 5).

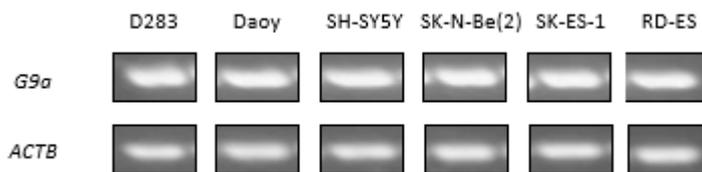
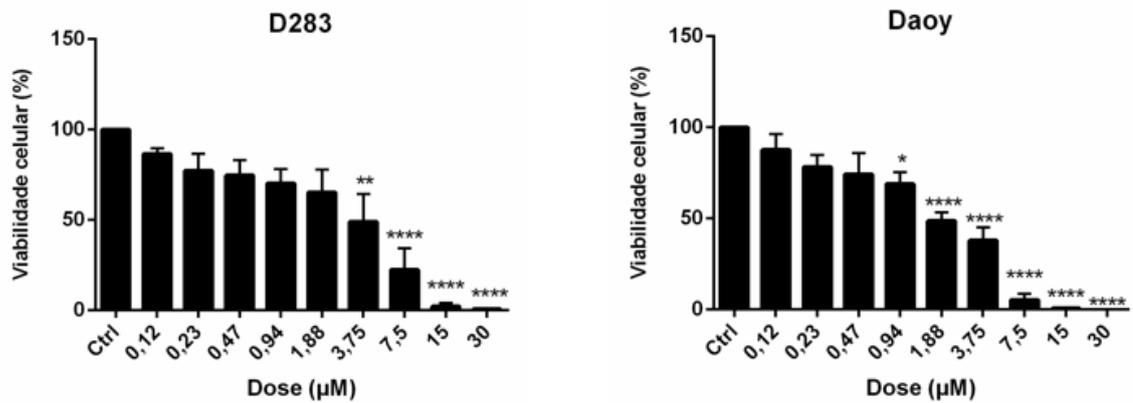


Figura 5: Níveis transcricionais de G9a nas linhagens celulares. RT-PCR dos genes *EHMT2/G9a* e *ACTB* das linhagens D283, Daoy, SH-SY5Y, SK-N-BE(2), SK-ES-1 e RD-ES. Experimento realizado em triplicata biológica.

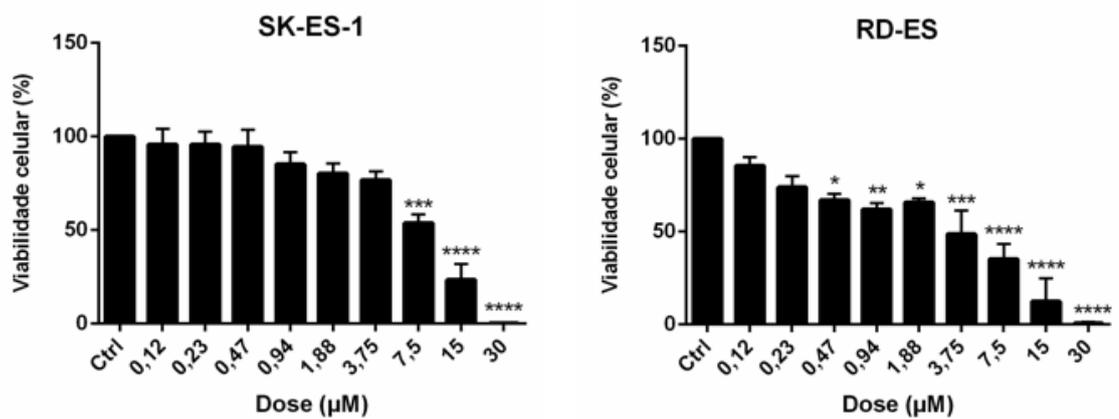
5.2 VIABILIDADE CELULAR E DETERMINAÇÃO DE IC₅₀ de UNC0642

Para avaliar o efeito da inibição de G9a nas linhagens celulares foram realizado curvas de dose com o inibidor UNC0642 por um período de 72 horas. Como demonstrado abaixo, (Figura 6) as seis linhagens celulares responderam de maneira dose dependente na presença do inibidor. A partir dos dados de viabilidade celular, obtidos por meio das curvas de dose, foi possível estabelecer uma dose capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (IC₅₀) para cada linhagem (Tabela 2).

A



B



C

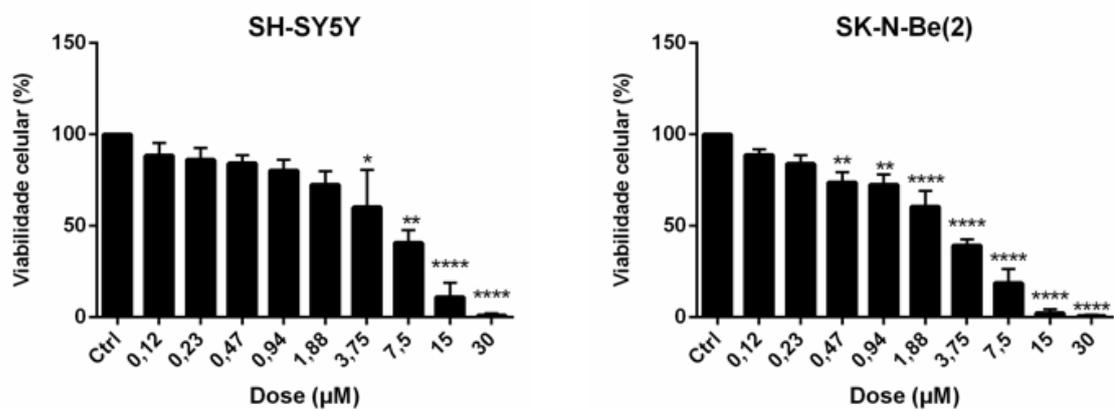


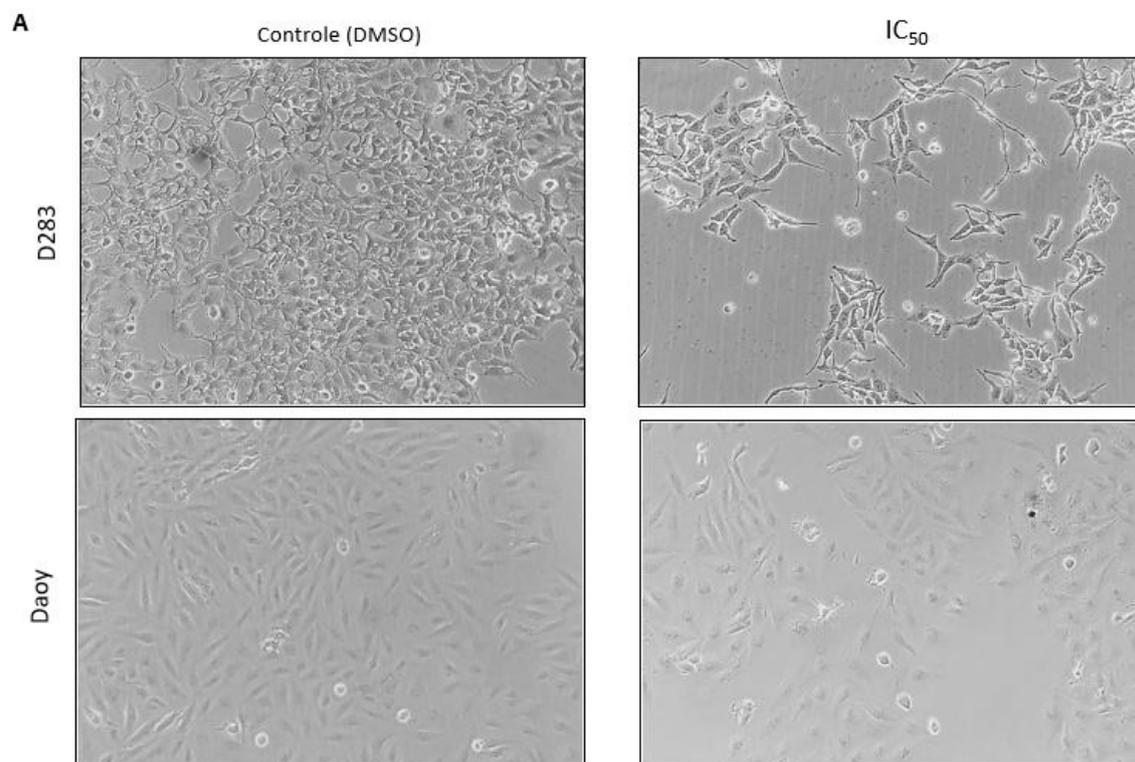
Figura 6: Efeito de UNC0642 sobre a viabilidade celular de linhagens de tumores pediátricos. Curvas de dose de UNC0642 nas seis linhagens celulares avaliadas. (A) D283 e Daoy. (B) SK-ES-1 e RD-ES. (C) SH-SY5Y e SK-N-Be(2). Os dados são apresentados como média \pm EPM (Erro Padrão da Média), comparando cada dose com grupo controle, ANOVA seguido de teste de Bonferroni. * $P <$

0.05; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

Tabela 2 – Valores de IC_{50} de UNC0642 das linhagens de tumores pediátricos

Linhagem	IC_{50} (μM)
D283	4,3 (3,0 – 6,2)
Daoy	1,8 (1,4 – 2,2)
SK-ES-1	9,1 (6,9 – 11,9)
RD-ES	5,25 (3,0 – 9,1)
SH-SY5Y	5,8 (2,2 – 15,8)
SK-N-Be(2)	2,6 (2,0 – 3,3)

Após a determinação do IC_{50} , foi realizada a captura de imagem das linhagens celulares (Figura 7) a fim de demonstrar um aparente acúmulo de granulosidades no interior das células decorrente do tratamento com o inibidor de G9a.



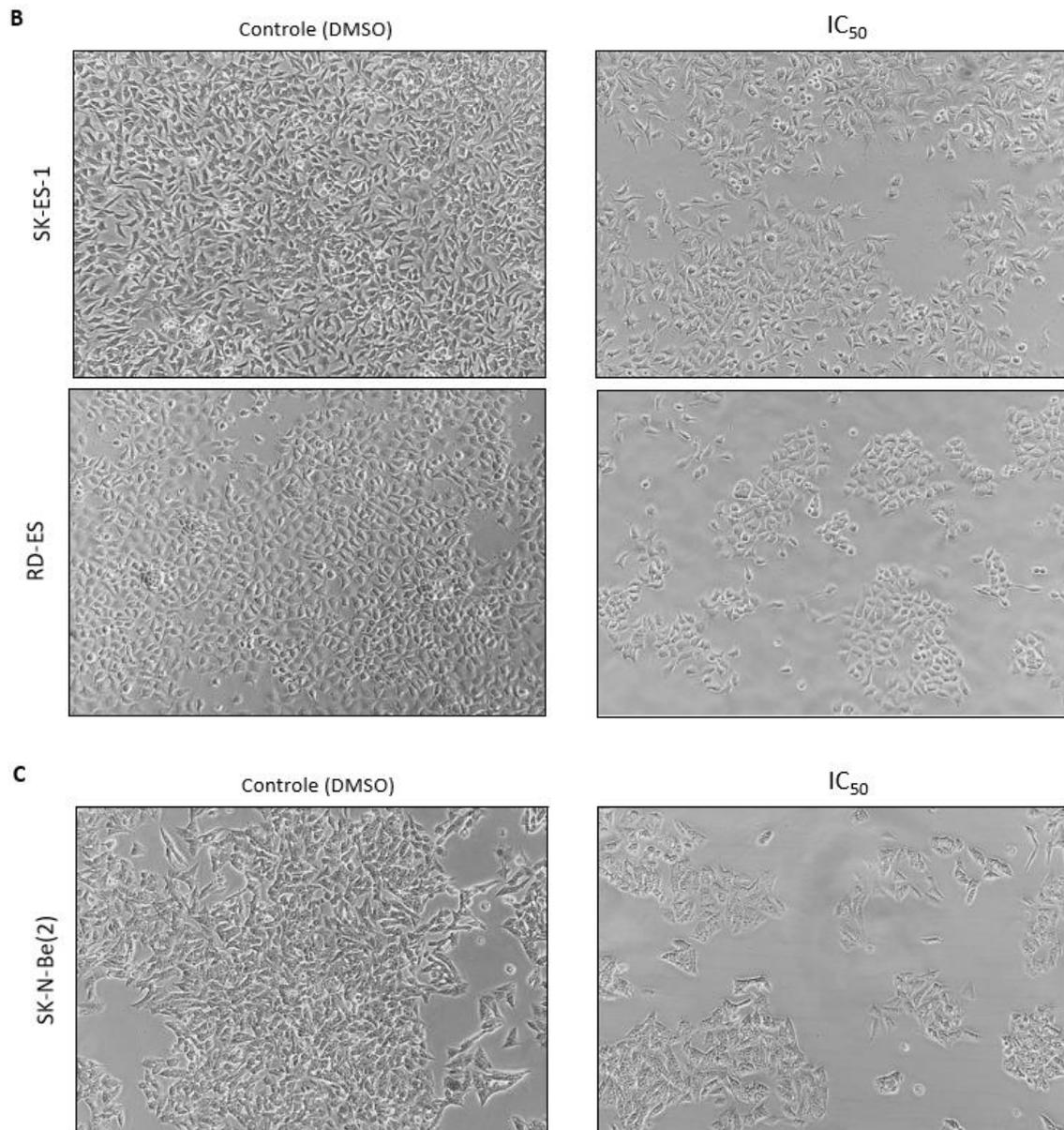


Figura 7: Representação do efeito morfológico em linhagens de tumores pediátricos após tratamento com UNC0642. Imagem das células controle (DMSO) e tratadas com UNC0642 na dose referente ao seu respectivo IC₅₀. (A) D283 e Daoy. (B) SK-ES-1 e RD-ES. (C) Sk-N-Be(2).

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE G9A E EFEITO APÓS A INIBIÇÃO DE G9A

Com o intuito de avaliar se as linhagens celulares de tumores pediátricos possuem diferentes níveis de expressão de *G9a*, foi realizado um RT-qPCR para verificar o nível relativo de mRNA de *G9a* nas linhagens avaliadas. O gene normalizador utilizado foi *ACTB* e a expressão relativa (*fold-change*) foi calculado em relação à linhagem RD-ES, uma vez que foi a linhagem que apresentou maiores níveis de *G9a*. O resultado abaixo (Figura 8) mostra que os níveis relativos de *G9a*

variam de acordo com a linhagem celular estudada. Além disso, também foram verificados os níveis de mRNA referentes a *G9a* após o tratamento com o inibidor UNC0642 (Figura 9). O resultado mostra que as linhagens SK-ES-1, D283 e Daoy apresentam níveis relativos de *G9a* menores que a linhagem RD-ES.

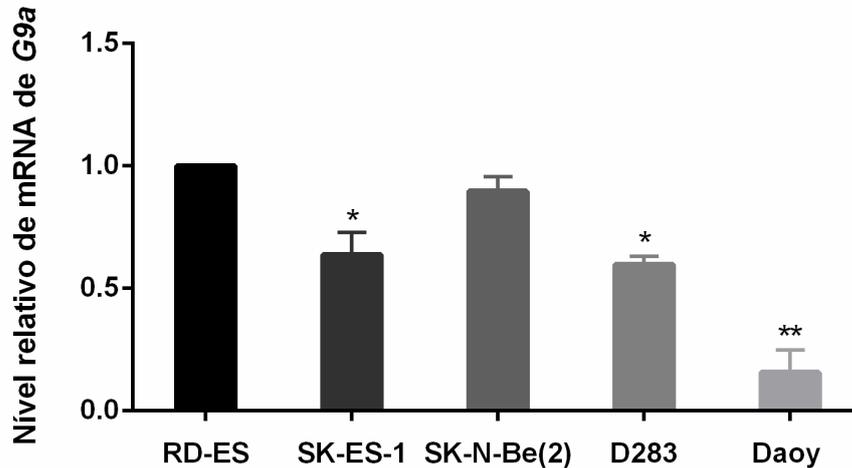


Figura 8. Níveis relativos de mRNA de *G9a* em linhagens de tumores pediátricos. Experimento de RT-qPCR das linhagens celulares avaliadas. O gene normalizador utilizado foi *ACTB*. Os dados são apresentados como média \pm EPM, comparando cada linhagem com a linhagem RD-ES, que obteve maior nível relativo de *G9a*; teste T não pareado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

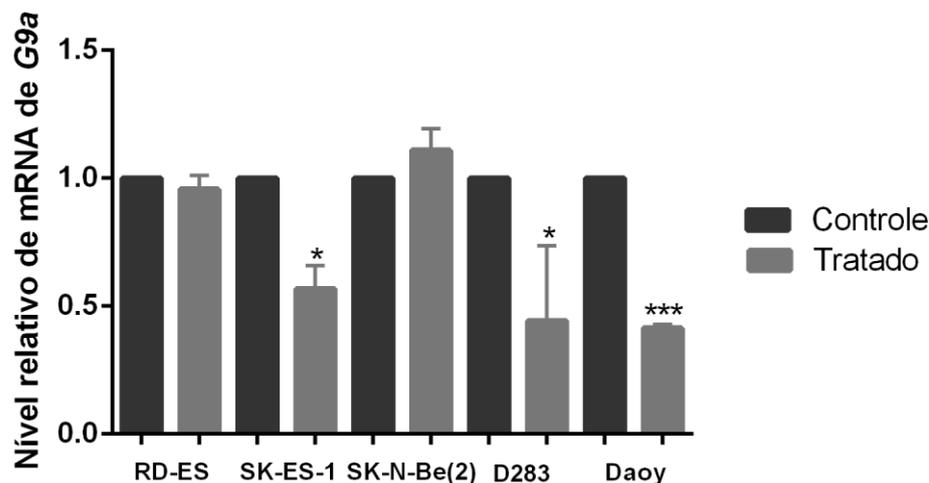


Figura 9: Níveis relativos de mRNA de *G9a* em linhagens de tumores pediátricos após tratamento com UNC0642. Experimento de RT-qPCR considerando o controle e o tratado com IC_{50} de cada linhagem celular avaliada. O gene normalizador utilizado foi *ACTB*. Os dados são apresentados como média \pm EPM, comparando o controle com o tratado, Teste T pareado. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

5.4 ANÁLISE DE GENES SUPRESSORES TUMORAIS

A fim de avaliar o reestabelecimento da expressão de genes supressores tumorais por meio da inibição de G9a foi realizada a técnica de RT-qPCR para os genes *p16INK4a* e *p21Cip1/Waf1*. O resultado mostrou que os níveis relativos de *p16INK4a* diminuíram com o tratamento do inibidor UNC0642 nas linhagens D283, SK-ES-1 e RD-ES e aumentaram na linhagem SK-N-Be(2) (Figura 10 A). Já os níveis relativos de *p21Cip1/Waf1* foram reduzidos nas linhagens D283, Daoy e SK-N-Be(2) e aumentaram na linhagem RD-ES (Figura 10 B).

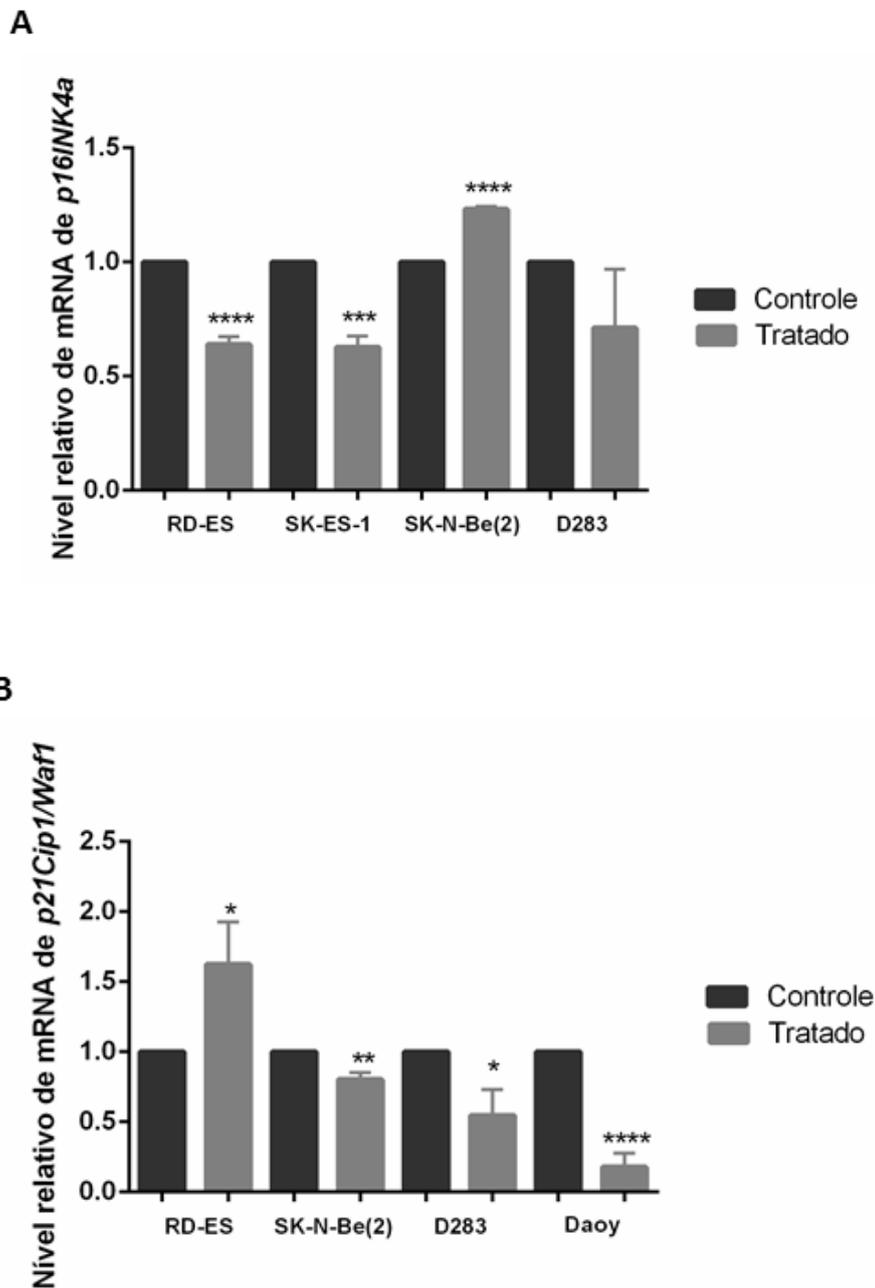


Figura 10: Níveis transcricionais relativos dos supressores tumorais *p16INK4a* e *p21Cip1/Waf1* em linhagens de tumores pediátricos antes e após tratamento com UNC0642. Experimento de

RT-qPCR considerando o controle e o tratado com IC_{50} . (A) Análise do gene *p16INK4a* nas linhagens RD-ES, SK-N-Be(2), D283 e Daoy. (B) Análise do gene *p21Cip1/Waf1* nas linhagens RD-ES, SK-ES-1, SK-N-Be(2) e D283. O gene normalizador utilizado foi *ACTB*. Os dados são apresentados como média \pm EPM, comparando o controle com o tratado, Teste T não pareado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

5.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO RELATIVA DE *BCL2*

Para analisar se o tratamento com o inibidor de G9a estaria causando morte pela modulação em vias de apoptose foi realizado um RT-qPCR do gene *BCL2*. O resultado obtido demonstra que a linhagem Daoy teve redução no nível relativo de *BCL2* enquanto as linhagens RD-ES e D283 apresentaram um aumento desse gene (Figura 11).

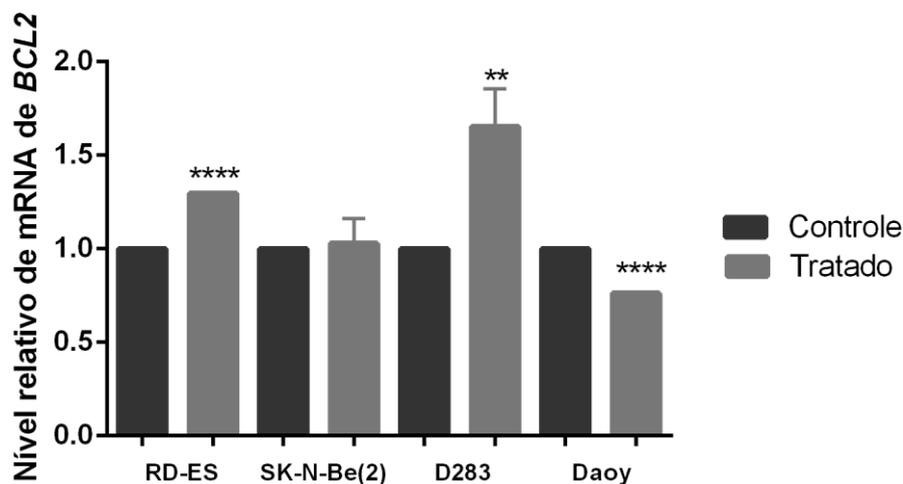


Figura 11: Avaliação do nível relativo transcricional de *BCL2* em linhagens de tumores pediátricos antes e após tratamento com UNC0642. Experimento de RT-qPCR considerando o controle e o tratado com IC_{50} das linhagens RD-ES, SK-N-Be(2), D283 e Daoy. O gene normalizador utilizado foi *ACTB*. Os dados são apresentados como média \pm EPM, comparando o controle com o tratado, Teste T não pareado. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

5.6 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE DIMETILAÇÃO DE H3K9

Para verificar se o tratamento com o inibidor de G9a altera o padrão de dimetilação de H3K9 foi realizado um Western Blotting da histona 3 lisina 9 dimetilada, uma vez que a enzima G9a é responsável pela adição do grupamento metil em H3K9. Esse experimento demonstrou que o tratamento com o inibidor de G9a afetou os níveis de dimetilação de H3K9 das linhagens de meduloblastoma,

indicando que UNC0642 altera o funcionamento da enzima G9a nas linhagens referentes a esse tumor (Figura 12).

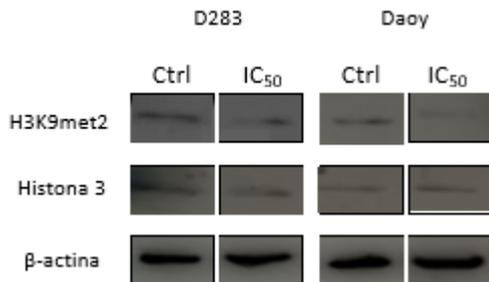
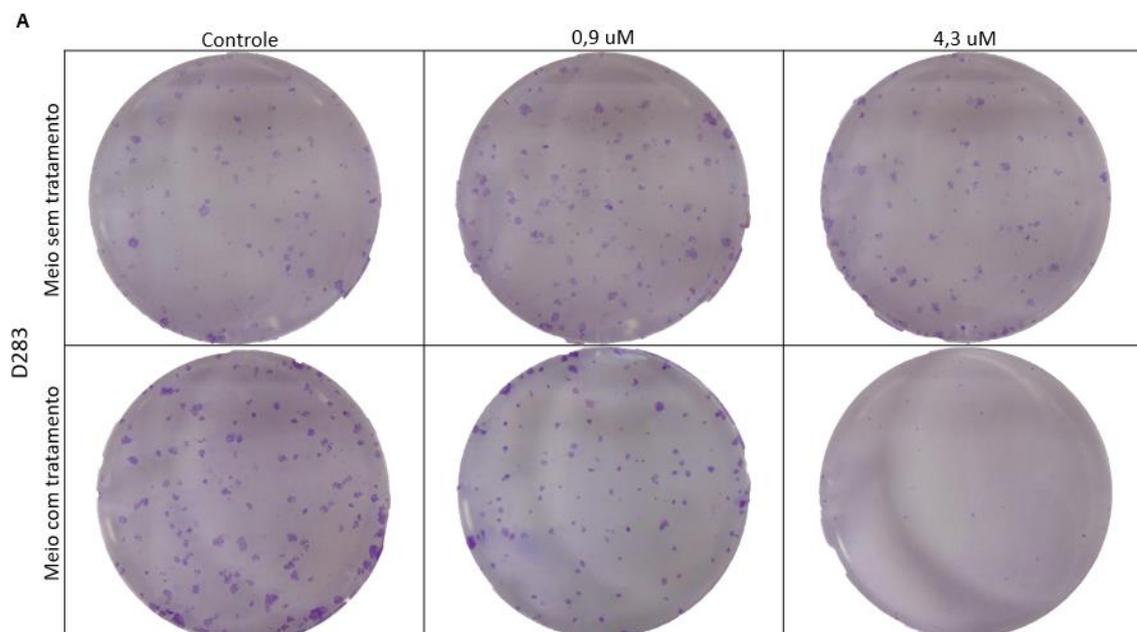
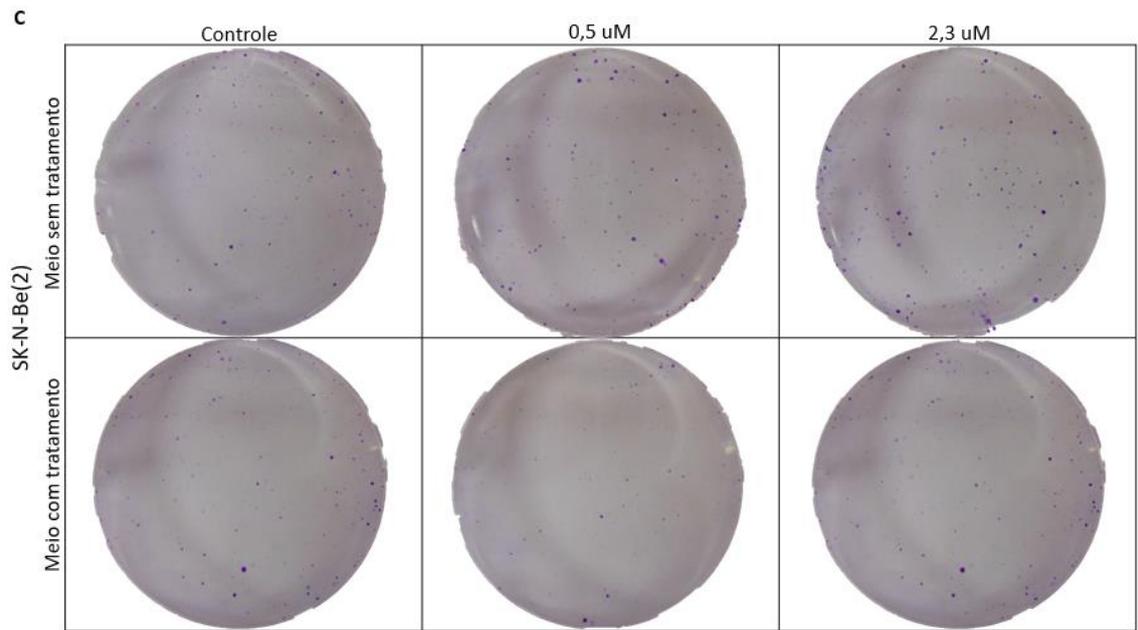
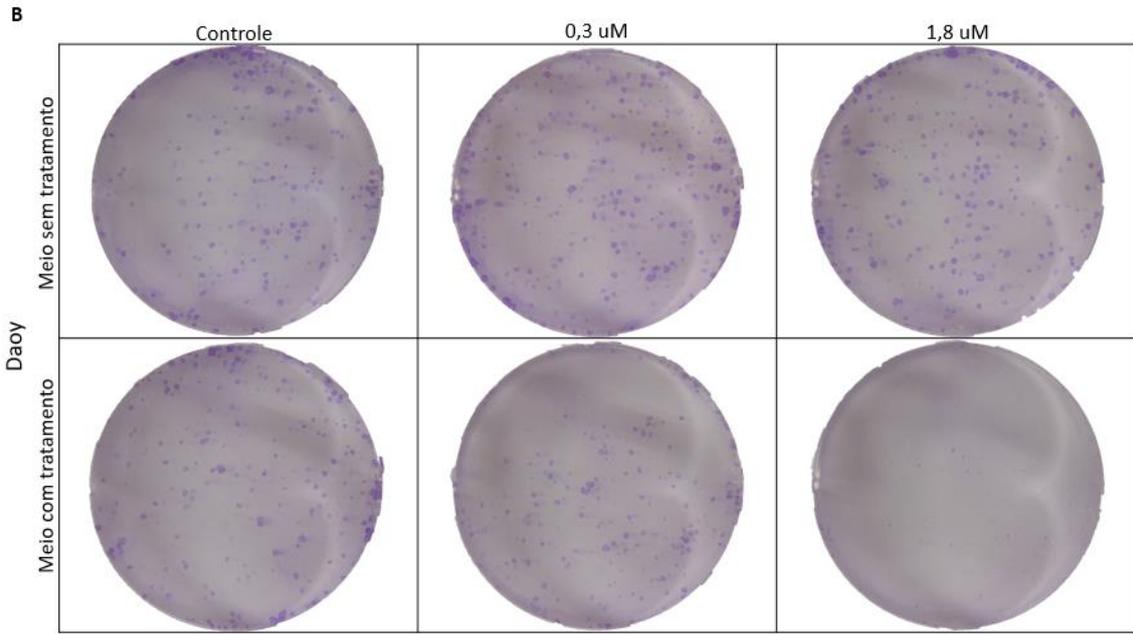


Figura 12: Avaliação dos níveis de dimetilação de H3K9 em linhagens de meduloblastoma após tratamento com UNC0642. Western Blotting para verificar os níveis de dimetilação de H3K9 nas linhagens D283 e Daoy, estão exibidos controle (DMSO) e tratado com o respectivo IC₅₀.

5.7 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA CELULAR

Para avaliar o efeito da inibição de G9a no processo de sobrevivência celular foi realizado o teste *in vitro* de clonogênico. O resultado desse experimento aponta que a inibição de G9a altera a capacidade de sobrevivência celular quando o inibidor se encontra em contato constante com as células (Figura 13).





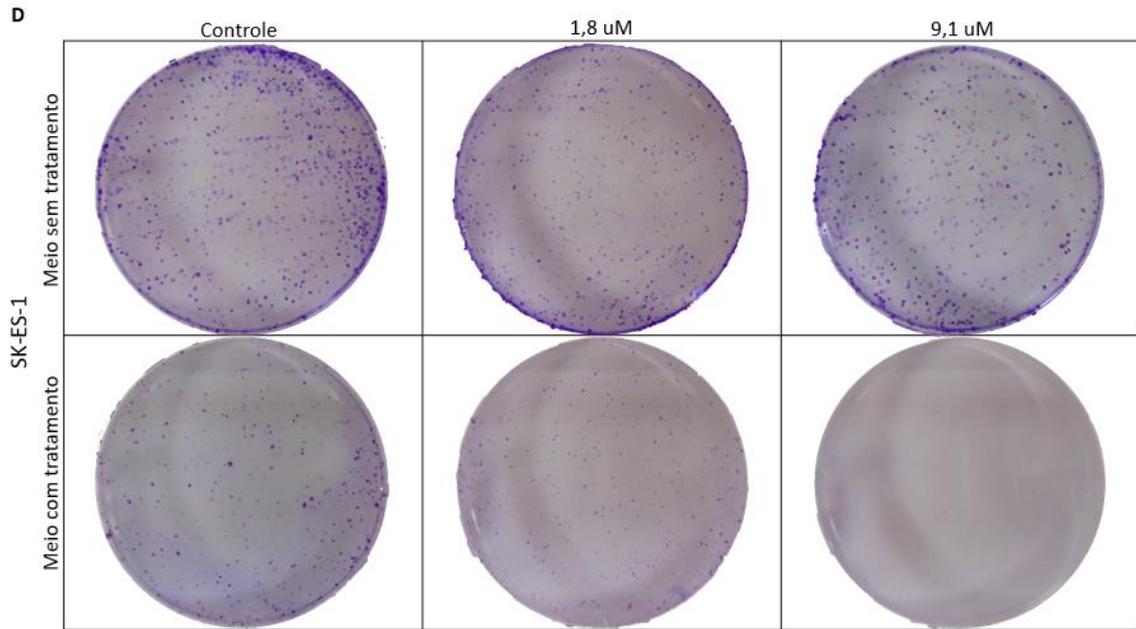


Figura 13: Ensaio de sobrevivência celular nas linhagens de tumores pediátricos após tratamento com UNC0642. As células foram tratadas de acordo com o grupo: controle (DMSO), dose inferior ao IC_{50} ou com IC_{50} por 72 horas. Em seguida foram replaqueadas e mantidas com meio sem ou com tratamento por 7 dias. (A) D283; (B) Daoy; (C) SK-N-Be(2); (D) SK-ES-1; (E) RD-ES. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

6 DISCUSSÃO

A atividade da enzima metiltransferase G9a tem sido considerada um alvo promissor no tratamento tumoral (SETON-ROGERS, 2019). Apesar disso, existem poucos estudos que exploram o papel de desse modulador epigenético em tumores sólidos pediátricos. Em meduloblastoma e sarcoma de Ewing, por exemplo, existem apenas estudos preliminares que apontam o envolvimento de G9a na proliferação e na resistência a quimioterapia, respectivamente (DOBSON; HATCHER; SWAMINATHAN; DAS *et al.*, 2017) (LIAO; XIE; XU; HUANG, 2018). Nesse estudo demonstramos um efeito antiproliferativo dose dependente com o inibidor seletivo para G9a, UNC0642, com as linhagens celulares referentes aos tumores meduloblastoma, neuroblastoma e sarcoma de Ewing, indicando que a atividade da enzima G9a e os níveis de metilação de H3K9 são necessários para a manutenção da viabilidade destas linhagens celulares. Além disso, Liu e colaboradores (2013) sugerem que existem linhagens celulares insensíveis a inibição de G9a, dessa forma, os resultados desse estudo indicam que as seis linhagens abordadas são sensíveis à alterações na atividade de G9a (LIU; BARSYTE-LOVEJOY; LI; XIONG *et al.*, 2013).

Os tumores pediátricos abordados nesse estudo são neoplasias com características distintas, dessa forma, era esperado uma variação nos níveis relativos de mRNA de G9a entre as linhagens. O resultado encontrado mostra que a linhagem RD-ES possui maiores níveis de expressão de G9a, seguida por SK-N-Be(2), SK-ES-1, D283 e Daoy. Esse resultado está de acordo com os dados do *Cancer Cell Line Encyclopedia* que estabelecem padrões de expressão de G9a similares aos encontrados (BARRETINA; CAPONIGRO; STRANSKY; VENKATESAN *et al.*, 2012).

Diante da comparação da expressão relativa de G9a nas linhagens estudadas, foi possível perceber que aquelas associadas a tumores mais agressivos e tumorigênicos possuem níveis mais altos de G9a. As linhagens SK-N-Be(2) e D283 são linhagens isoladas de sítios metastáticos e representam subgrupos com piores prognósticos de seus respectivos tumores. Já as linhagens RD-ES e SK-ES-1, representam sarcoma de Ewing, que é considerado um tumor agressivo e metastático. Enquanto a linhagem Daoy, que possui a menor quantidade de expressão de G9a, representa o subgrupo SHH, que possui um prognóstico

intermediário e raramente são encontradas metástases. A associação entre os níveis de expressão de *G9a* e tumores mais agressivos, metastáticos e de pior prognósticos já está descrita em cânceres de pulmão, fígado e cervical (CHEN; HUA; KAO; CHI *et al.*, 2010) (QIN; LI; ZENG; WU *et al.*, 2018) (CHEN; SHUN; YEN; CHOU *et al.*, 2017). Dito isso, os resultados desse estudo podem ser considerados dados preliminares para propor uma mesma associação nas neoplasias pediátricas meduloblastoma, neuroblastoma e sarcoma de Ewing.

Após estabelecer os níveis relativos de *G9a* em cada linhagem foi explorado se esses níveis eram alterados pela inibição da enzima *G9a*. O resultado esperado nessa comparação era que não teríamos alterações nos níveis da enzima, uma vez que o inibidor utilizado nesse estudo, UNC0642, é um inibidor competitivo com o substrato, impedindo a ligação do substrato com *G9a* (Figura 14). Entretanto, foi encontrado que as linhagens SK-ES-1, D283 e Daoy obtiveram menores níveis relativos de expressão de *G9a* após o tratamento. Até o momento não foram publicados estudos que abordam a regulação transcricional de *G9a* após inibição, dessa forma, são necessários mais estudos para propor uma explicação para a redução dos níveis de *G9a*.

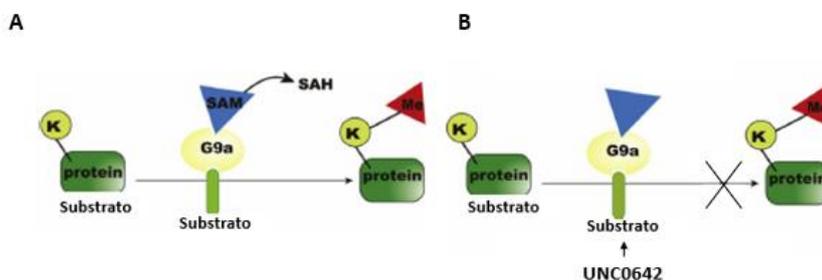


Figura 14: Ação do inibidor de *G9a*, UNC0642. A. Atividade de metiltransferase de *G9a*. B. Inibição competitiva pelo substrato de UNC0642 impedindo a adição do grupamento metil. Adaptado de *Recent progress in histone methyltransferase (G9a) inhibitors as anticancer agents*.

Mutações e alterações genéticas em oncogenes e genes supressores tumorais são consideradas relevantes para o desenvolvimento tumoral, visto que a instabilidade genética é uma característica que favorece o processo de tumorigênese. Genes supressores tumorais são genes associados ao funcionamento correto do processo de replicação celular, agindo no controle da proliferação e impedindo a formação tumoral. Dentre os genes supressores tumorais

que se encontram alterados em diversos tumores temos *p16INK4a* e *p21Cip1/Waf1* (TSIHLIAS; KAPUSTA; SLINGERLAND, 1999).

p16INK4a é o principal membro da família de inibidores de CDK (quinase dependente de ciclina) que são essenciais para a progressão do ciclo celular (RUSSO; TONG; LEE; JEFFREY *et al.*, 1998). Dessa forma, *p16INK4a* é considerado um supressor tumoral por alterar a continuidade do ciclo celular e impedir a proliferação celular (MEDEMA; HERRERA; LAM; WEINBERG, 1995). A expressão elevada de *p16INK4a* é vista como um mecanismo antiproliferativo relevante para terapias antitumorais. Apesar disso, existem estudos que apontam que a superexpressão de *p16INK4a* pode estar envolvida no mecanismo de invasão em células tumorais, demonstrando a importância da regulação desse gene no desenvolvimento tumoral (JUNG; SCHRAUDER; OSWALD; KNOLL *et al.*, 2001). Outro supressor tumoral capaz de inibir CDKs e alterar a progressão do ciclo celular é o *p21Cip1/Waf1* (GARTEL; SERFAS; TYNER, 1996). Estudos apontam que esse supressor tumoral está relacionado a diminuição do crescimento tumoral e a regulação de genes envolvidos no processo de apoptose, visto que a expressão de *p21Cip1/Waf1* pode ser correlacionada positivamente com a repressão de genes envolvidos na proliferação celular (CHANG; WATANABE; BROUDE; FANG *et al.*, 2000).

A inibição da enzima metiltransferase G9a tem sido considerada um alvo na terapia tumoral, uma vez que é capaz de alterar os níveis de metilação de H3K9 e a hipermetilação do resíduo dessa histona está associada ao silenciamento de diversos genes (NGUYEN; WEISENBERGER; VELICESCU; GONZALES *et al.*, 2002). Estudos apontam que genes supressores tumorais como *MASPIN* e *p16INK4a* seriam alvo de silenciamento por meio da hipermetilação de H3K9 (WOZNIAK; KLIMECKI; LAU; FEINSTEIN *et al.*, 2007). Dessa forma, era esperado que a inibição de G9a nas linhagens de tumores pediátricos seria capaz de reestabelecer a expressão de genes supressores tumorais.

Nesse estudo foram avaliados os níveis relativos de *p16INK4a* e *p21Cip1/Waf1* em células tratadas e não tratadas. Esperava-se que os níveis desses dois supressores tumorais aumentassem uma vez que as suas expressões já foram correlacionadas com os níveis de metilação de H3K9 (WU; WANG; LI; ZHAO *et al.*, 2008) (HUO; GE; TIAN; SUN *et al.*, 2017). Entretanto, o resultado encontrado foi

uma diminuição dos níveis de *p16INK4a* e *p21Cip1/Waf1* na maioria das linhagens. Wu e colaboradores (2008) mostraram que a inibição de G9a e SUV39H1, outra enzima metiltransferase específica para H3K9, é capaz de diminuir os níveis de di e trimetilação de H3K9 e alterar a estrutura da cromatina em torno do promotor de *p16INK4a*. Dessa forma, uma possível explicação para os níveis de *p16INK4a* terem reduzido com a inibição de G9a seria o tempo de tratamento utilizado nesse estudo, pois, mecanismos de regulação desse gene poderiam estar atuando na diminuição tardia dos níveis de *p16INK4a* como uma forma de sobrevivência das células após a inibição de G9a. Uma alternativa para corroborar essa hipótese é a verificação dos níveis de *p16INK4a* após 24 e ou 48 horas de tratamento com inibidor de G9a.

Já a diminuição nos níveis de *p21Cip1/Waf1* podem ter ocorrido devido ao mesmo motivo que *p16INK4a* ou então devido a atividade independente da função de histona metiltransferase de G9a. Estudos recentes mostram que G9a regula positivamente a expressão de *p21Cip1/Waf1*, uma vez que o *knockdown* de G9a reduz a atividade do promotor de *p21Cip1/Waf1*, diminuindo os níveis de expressão desse gene (OH; KIM; CHAE; KANG *et al.*, 2014). Logo, essa poderia ser uma explicação para os níveis de *p21Cip1/Waf1* estarem menores nas linhagens de meduloblastoma e neuroblastoma pois o inibidor de G9a, UNC0642, poderia alterar a conformação de G9a impedindo sua atividade no promotor de *p21Cip1/Waf1*. Além disso, a diminuição nos níveis relativos de G9a após o tratamento também poderia ser um fator para diminuição dos níveis relativos de *p21Cip1/Waf1*, visto que a atividade de G9a é necessária para expressão desse gene. Esse efeito poderia ser tecido específico, uma vez que foram observados baixos níveis de *p21Cip1/Waf1* apenas nas linhagens representante de tumores de sistema nervoso, enquanto na linhagem RD-ES, de sarcoma de Ewing, foi observado um aumento de *p21Cip1/Waf1*.

BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) é uma família de proteínas que estão associadas a ativação de vias de apoptose em resposta a stress celular como dano ao DNA e ativação de oncogenes. Esta família de proteínas possui membros que previnem apoptose, como BCL-XL, MCL-1 e BCL-2, e aqueles que induzem apoptose, como BAD, BAX, BAK. Logo, o desequilíbrio nos níveis dessas proteínas define um desfecho de morte ou sobrevivência (HOTCHKISS; STRASSER; MCDUNN; SWANSON, 2009). A proteína BCL-2 está relacionada com mecanismos de sobrevivência celular e a progressão tumoral (JOHNSTONE; RUEFLI; LOWE, 2002).

Por isso, não é surpreendente que diversas proteínas anti-apoptose estão superexpressas em diferentes tipos tumorais (HELLEMANS; VAN DAM; WEYLER; VAN OOSTEROM *et al.*, 1995) (KARNAK; XU, 2010).

A inibição de G9a nas linhagens de tumores pediátricos alterou a viabilidade dessas células e foi observada a presença de aparentes granulosidades nas células após o tratamento. Essa observação trouxe o questionamento se a inibição de G9a não estaria ativando vias de apoptose nas linhagens estudadas. Em tumores gástricos, de pulmão e de sistema nervoso central, como glioblastoma, a inibição de G9a foi correlacionada com a ativação de vias apoptóticas a partir da redução dos níveis de Bcl-2 (LIN; HUANG; ZOU; CHEN *et al.*, 2016) (WAN; LYU; YU; ZHOU *et al.*, 2017) (GUO; HUANG; MA; LIN, 2016). Dessa forma, era esperado uma diminuição dos níveis de *BCL2* nas linhagens de tumores pediátricos. Entretanto, apenas a linhagem Daoy, de meduloblastoma, teve redução nos níveis de *BCL2*. Uma possível explicação para a ausência de diminuição de *BCL2* é que inibição de G9a não ocasiona apoptose por essa via de ativação ou então que a inibição estaria desencadeando outro mecanismo de morte, como autofagia. Ke e colaboradores (2014) sugerem que a inibição da enzima G9a está associada a autofagia em linhagens de neuroblastoma humano (KE; ZHANG; ZHU; XIA *et al.*, 2014). Isso poderia explicar porque os níveis de *BCL2* não foram alterados na linhagem de neuroblastoma SK-N-Be(2). Uma perspectiva para corroborar a ativação da via de apoptose na linhagem Daoy é avaliar os níveis de outra proteína da família Bcl2, Bax, que tem seus níveis aumentados no processo de morte por apoptose.

Após avaliar os efeitos imediatos da inibição de G9a foi proposto avaliar o efeito dessa inibição na capacidade de sobrevivência celular. O resultado obtido indica que, apesar do tratamento com o inibidor UNC0642 diminuir a viabilidade celular, sua atividade não altera permanentemente a capacidade de sobrevivência das células analisada. Uma explicação para esse efeito é que a diminuição dos níveis de dimetilação pela inibição de G9a é transitória. A avaliação, por western blotting, da dimetilação de H3K9 nas linhagens de meduloblastoma sugere que o tratamento por 72 horas com o inibidor de G9a é capaz de diminuir a taxa de H3K9 dimetilada nessas duas linhagens. Dessa forma, acredita-se que, ao longo dos 7 dias de acompanhamento do experimento de sobrevivência celular, os níveis de dimetilação retornariam as taxas iniciais. Um dado que corrobora essa hipótese é a avaliação do experimento de sobrevivência com a presença constante do

tratamento, pois esse resultado mostra que as células em constante estímulo de inibição diminuem sua capacidade de formar colônias. Uma perspectiva para verificar essa hipótese é analisar as taxas de dimetilação de H3K9 após períodos mais longos que 72 horas de tratamento, pois assim analisaríamos se a diminuição nos níveis de dimetilação é permanente ou transitória.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, buscou-se avaliar a inibição de G9a como um potencial alvo terapêutico para tumores pediátricos, analisando sua atividade em relação à viabilidade e sobrevivência celular. Além disso, também foi verificado se as alterações nos níveis de dimetilação de H3K9, causada pela inibição de G9a, eram capazes de alterar os níveis de genes supressores tumorais.

Os resultados obtidos nesse estudo são dados preliminares que sugerem que a histona metiltransferase G9a faz parte de um mecanismo epigenético relevante para o desenvolvimento e progressão de tumores pediátricos. Apesar dos dados encontrados serem promissores, existe uma necessidade de explorar o efeito da alteração nos padrões de metilação de H3K9 em mecanismos específicos de proliferação, sobrevivência, morte celular e silenciamento gênico.

REFERÊNCIAS

AHMED, A. A.; ZHANG, L.; REDDIVALLA, N.; HETHERINGTON, M. Neuroblastoma in children: Update on clinicopathologic and genetic prognostic factors. **Pediatr Hematol Oncol**, 34, n. 3, p. 165-185, Apr 2017.

ARVAND, A.; DENNY, C. T. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. **Oncogene**, 20, n. 40, p. 5747-5754, Sep 2001.

BARRETINA, J.; CAPONIGRO, G.; STRANSKY, N.; VENKATESAN, K. *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. **Nature**, 483, n. 7391, p. 603-607, Mar 2012.

BARSKI, A.; CUDDAPAH, S.; CUI, K.; ROH, T. Y. *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. **Cell**, 129, n. 4, p. 823-837, May 2007.

BELL, E.; LUNEC, J.; TWEDDLE, D. A. Cell cycle regulation targets of MYCN identified by gene expression microarrays. **Cell Cycle**, 6, n. 10, p. 1249-1256, May 2007.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, 68, n. 6, p. 394-424, 11 2018.

CAO, Y. P.; SUN, J. Y.; LI, M. Q.; DONG, Y. *et al.* Inhibition of G9a by a small molecule inhibitor, UNC0642, induces apoptosis of human bladder cancer cells. **Acta Pharmacol Sin**, 40, n. 8, p. 1076-1084, Aug 2019.

CAVALLI, F. M. G.; REMKE, M.; RAMPASEK, L.; PEACOCK, J. *et al.* Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. **Cancer Cell**, 31, n. 6, p. 737-754.e736, 06 2017.

CHANG, B. D.; WATANABE, K.; BROUDE, E. V.; FANG, J. *et al.* Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97, n. 8, p. 4291-4296, Apr 2000.

CHEN, H.; YAN, Y.; DAVIDSON, T. L.; SHINKAI, Y. *et al.* Hypoxic stress induces dimethylated histone H3 lysine 9 through histone methyltransferase G9a in mammalian cells. **Cancer Res**, 66, n. 18, p. 9009-9016, Sep 2006.

CHEN, M. W.; HUA, K. T.; KAO, H. J.; CHI, C. C. *et al.* H3K9 histone methyltransferase G9a promotes lung cancer invasion and metastasis by silencing the cell adhesion molecule Ep-CAM. **Cancer Res**, 70, n. 20, p. 7830-7840, Oct 2010.

CHEN, R. J.; SHUN, C. T.; YEN, M. L.; CHOU, C. H. *et al.* Methyltransferase G9a promotes cervical cancer angiogenesis and decreases patient survival. **Oncotarget**, 8, n. 37, p. 62081-62098, Sep 2017.

CHEUNG, N. K.; DYER, M. A. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. **Nat Rev Cancer**, 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013.

COLLINS, R. E.; NORTHROP, J. P.; HORTON, J. R.; LEE, D. Y. *et al.* The ankyrin repeats of G9a and GLP histone methyltransferases are mono- and dimethyllysine binding modules. **Nat Struct Mol Biol**, 15, n. 3, p. 245-250, Mar 2008.

CROMPTON, B. D.; STEWART, C.; TAYLOR-WEINER, A.; ALEXE, G. *et al.* The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. **Cancer Discov**, 4, n. 11, p. 1326-1341, Nov 2014.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. **Cell**, 150, n. 1, p. 12-27, Jul 2012.

DOBSON, T. H. W.; HATCHER, R. J.; SWAMINATHAN, J.; DAS, C. M. *et al.* Regulation of. **Mol Cancer Res**, 15, n. 8, p. 1073-1084, 08 2017.

DUCASSE, M.; BROWN, M. A. Epigenetic aberrations and cancer. **Mol Cancer**, 5, p. 60, Nov 2006.

GARTEL, A. L.; SERFAS, M. S.; TYNER, A. L. p21--negative regulator of the cell cycle. **Proc Soc Exp Biol Med**, 213, n. 2, p. 138-149, Nov 1996.

GUO, A. S.; HUANG, Y. Q.; MA, X. D.; LIN, R. S. Mechanism of G9a inhibitor BIX-01294 acting on U251 glioma cells. **Mol Med Rep**, 14, n. 5, p. 4613-4621, Nov 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 2011.

HELLEMANS, P.; VAN DAM, P. A.; WEYLER, J.; VAN OOSTEROM, A. T. *et al.* Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer. **Br J Cancer**, 72, n. 2, p. 354-360, Aug 1995.

HIYAMA, E.; HIYAMA, K.; YOKOYAMA, T.; MATSUURA, Y. *et al.* Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. **Nat Med**, 1, n. 3, p. 249-255, Mar 1995.

HOTCHKISS, R. S.; STRASSER, A.; MCDUNN, J. E.; SWANSON, P. E. Cell death. **N Engl J Med**, 361, n. 16, p. 1570-1583, Oct 2009.

HUANG, J.; DORSEY, J.; CHUIKOV, S.; PÉREZ-BURGOS, L. *et al.* G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. **J Biol Chem**, 285, n. 13, p. 9636-9641, Mar 2010.

HUO, Q.; GE, C.; TIAN, H.; SUN, J. *et al.* Dysfunction of IKZF1/MYC/MDIG axis contributes to liver cancer progression through regulating H3K9me3/p21 activity. **Cell Death Dis**, 8, n. 5, p. e2766, 05 2017.

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil 2018.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, 293, n. 5532, p. 1074-1080, Aug 2001.

JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A. A.; LOWE, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, 108, n. 2, p. 153-164, Jan 2002.

JUNG, A.; SCHRAUDER, M.; OSWALD, U.; KNOLL, C. *et al.* The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. **Am J Pathol**, 159, n. 5, p. 1613-1617, Nov 2001.

KANWAL, R.; GUPTA, S. Epigenetics and cancer. **J Appl Physiol (1985)**, 109, n. 2, p. 598-605, Aug 2010.

KARNAK, D.; XU, L. Chemosensitization of prostate cancer by modulating Bcl-2 family proteins. **Curr Drug Targets**, 11, n. 6, p. 699-707, Jun 2010.

KE, X. X.; ZHANG, D.; ZHU, S.; XIA, Q. *et al.* Inhibition of H3K9 methyltransferase G9a repressed cell proliferation and induced autophagy in neuroblastoma cells. **PLoS One**, 9, n. 9, p. e106962, 2014.

KOOL, M.; KORSHUNOV, A.; REMKE, M.; JONES, D. T. *et al.* Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. **Acta Neuropathol**, 123, n. 4, p. 473-484, Apr 2012.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, 128, n. 4, p. 693-705, Feb 2007.

LIAO, H.; XIE, X.; XU, Y.; HUANG, G. Identification of driver genes associated with chemotherapy resistance of Ewing's sarcoma. **Onco Targets Ther**, 11, p. 6947-6956, 2018.

LIN, P. P.; WANG, Y.; LOZANO, G. Mesenchymal Stem Cells and the Origin of Ewing's Sarcoma. **Sarcoma**, 2011, 2011.

LIN, X.; HUANG, Y.; ZOU, Y.; CHEN, X. *et al.* Depletion of G9a gene induces cell apoptosis in human gastric carcinoma. **Oncol Rep**, 35, n. 5, p. 3041-3049, May 2016.

LIU, F.; BARSYTE-LOVEJOY, D.; LI, F.; XIONG, Y. *et al.* Discovery of an in vivo chemical probe of the lysine methyltransferases G9a and GLP. **J Med Chem**, 56, n. 21, p. 8931-8942, Nov 2013.

LONDON, W. B.; CASTLEBERRY, R. P.; MATTHAY, K. K.; LOOK, A. T. *et al.* Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. **J Clin Oncol**, 23, n. 27, p. 6459-6465, Sep 2005.

MARIS, J. M.; DENNY, C. T. Focus on embryonal malignancies. **Cancer Cell**, 2, n. 6, p. 447-450, Dec 2002.

MARIS, J. M.; HOGARTY, M. D.; BAGATELL, R.; COHN, S. L. Neuroblastoma. **Lancet**, 369, n. 9579, p. 2106-2120, Jun 2007.

MEDEMA, R. H.; HERRERA, R. E.; LAM, F.; WEINBERG, R. A. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 14, p. 6289-6293, Jul 1995.

MILLARD, N. E.; DE BRAGANCA, K. C. Medulloblastoma. **J Child Neurol**, 31, n. 12, p. 1341-1353, 10 2016.

NGUYEN, C. T.; WEISENBERGER, D. J.; VELICESCU, M.; GONZALES, F. A. *et al.* Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. **Cancer Res**, 62, n. 22, p. 6456-6461, Nov 2002.

NORTHCOTT, P. A.; KORSHUNOV, A.; PFISTER, S. M.; TAYLOR, M. D. The clinical implications of medulloblastoma subgroups. **Nat Rev Neurol**, 8, n. 6, p. 340-351, May 2012.

NORTHCOTT, P. A.; KORSHUNOV, A.; WITT, H.; HIELSCHER, T. *et al.* Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. **J Clin Oncol**, 29, n. 11, p. 1408-1414, Apr 2011.

NORTHCOTT, P. A.; SHIH, D. J.; PEACOCK, J.; GARZIA, L. *et al.* Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. **Nature**, 488, n. 7409, p. 49-56, Aug 2012.

NÖR, C.; SASSI, F. A.; DE FARIAS, C. B.; SCHWARTSMANN, G. *et al.* The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. **Mol Neurobiol**, 48, n. 3, p. 533-543, Dec 2013.

OH, S. T.; KIM, K. B.; CHAE, Y. C.; KANG, J. Y. *et al.* H3K9 histone methyltransferase G9a-mediated transcriptional activation of p21. **FEBS Lett**, 588, n. 5, p. 685-691, Mar 2014.

ORDÓÑEZ, J. L.; OSUNA, D.; HERRERO, D.; DE ALAVA, E. *et al.* Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead? **Cancer Res**, 69, n. 18, p. 7140-7150, Sep 2009.

PEDIATRIA, S. B. D. Atuação do pediatra: epidemiologia e diagnóstico precoce do câncer pediátrico. 2017.

PIZER, B. L.; CLIFFORD, S. C. The potential impact of tumour biology on improved clinical practice for medulloblastoma: progress towards biologically driven clinical trials. **Br J Neurosurg**, 23, n. 4, p. 364-375, Aug 2009.

QIN, J.; LI, Q.; ZENG, Z.; WU, P. *et al.* Increased expression of G9A contributes to carcinogenesis and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Oncol Lett**, 15, n. 6, p. 9757-9765, Jun 2018.

ROSS, K. A.; SMYTH, N. A.; MURAWSKI, C. D.; KENNEDY, J. G. The biology of ewing sarcoma. **ISRN Oncol**, 2013, p. 759725, 2013.

RUSSO, A. A.; TONG, L.; LEE, J. O.; JEFFREY, P. D. *et al.* Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. **Nature**, 395, n. 6699, p. 237-243, Sep 1998.

SANTOS-REBOUÇAS, C. B.; PIMENTEL, M. M. Implication of abnormal epigenetic patterns for human diseases. **Eur J Hum Genet**, 15, n. 1, p. 10-17, Jan 2007.

SETON-ROGERS, S. Get to know your epigenetic target. **Nat Rev Cancer**, 19, n. 2, p. 62-63, 02 2019.

SHINKAI, Y.; TACHIBANA, M. H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. **Genes Dev**, 25, n. 8, p. 781-788, Apr 2011.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA Cancer J Clin**, 69, n. 1, p. 7-34, Jan 2019.

SOUZA, B. K.; DA COSTA LOPEZ, P. L.; MENEGOTTO, P. R.; VIEIRA, I. A. *et al.* Targeting Histone Deacetylase Activity to Arrest Cell Growth and Promote Neural Differentiation in Ewing Sarcoma. **Mol Neurobiol**, 55, n. 9, p. 7242-7258, Sep 2018.

TACHIBANA, M.; UEDA, J.; FUKUDA, M.; TAKEDA, N. *et al.* Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. **Genes Dev**, 19, n. 7, p. 815-826, Apr 2005.

TANAKA, N.; FUKUZAWA, M. MYCN downregulates integrin alpha1 to promote invasion of human neuroblastoma cells. **Int J Oncol**, 33, n. 4, p. 815-821, Oct 2008.

TAYLOR, M. D.; NORTHCOTT, P. A.; KORSHUNOV, A.; REMKE, M. *et al.* Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. **Acta Neuropathol**, 123, n. 4, p. 465-472, Apr 2012.

TOOMEY, E. C.; SCHIFFMAN, J. D.; LESSNICK, S. L. Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. **Oncogene**, 29, n. 32, p. 4504-4516, Aug 2010.

TSIHILIAS, J.; KAPUSTA, L.; SLINGERLAND, J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. **Annu Rev Med**, 50, p. 401-423, 1999.

Types of Cancer Treatment. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>, 2019. Accessed: 08/10/2019.

WADDINGTON, C. H. Towards a theoretical biology. **Nature**, 218, n. 5141, p. 525-527, May 1968.

WAN, H. J.; LYU, W.; YU, L.; ZHOU, Z. Y. *et al.* [Inhibition of G9a attenuates cell proliferation via the mitochondrial apoptosis pathway in lung adenocarcinoma]. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, 39, n. 1, p. 13-17, Jan 2017.

WOZNIAK, R. J.; KLIMECKI, W. T.; LAU, S. S.; FEINSTEIN, Y. *et al.* 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. **Oncogene**, 26, n. 1, p. 77-90, Jan 2007.

WU, L. P.; WANG, X.; LI, L.; ZHAO, Y. *et al.* Histone deacetylase inhibitor depsipeptide activates silenced genes through decreasing both CpG and H3K9 methylation on the promoter. **Mol Cell Biol**, 28, n. 10, p. 3219-3235, May 2008.

ZHUKOVA, N.; RAMASWAMY, V.; REMKE, M.; PFAFF, E. *et al.* Subgroup-specific prognostic implications of TP53 mutation in medulloblastoma. **J Clin Oncol**, 31, n. 23, p. 2927-2935, Aug 2013.